

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-205676

(43)公開日 平成6年(1994)7月26日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/10		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数16 F D (全 6 頁)

(21)出願番号	特願平4-350818	(71)出願人	000252300 和光純薬工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(22)出願日	平成4年(1992)12月4日	(72)発明者	王 ▲ろう▼ 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内
		(72)発明者	石澤 勝己 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内
		(72)発明者	平安 一成 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(54)【発明の名称】 全血液検体からのDNA抽出方法及び抽出キット

(57)【要約】

【構成】 本発明は、全血液検体に界面活性剤を接触させて血球細胞の細胞膜を破壊し、露出した細胞核を集め、更に界面活性剤と蛋白質分解酵素で処理して核膜及び核蛋白質を破壊した後、カオトロピック剤と接触させてDNA鎖を遊離させ、該遊離されたDNA鎖を含む溶液にアルコール類を加えてDNA鎖を沈澱させることを特徴とするDNA鎖抽出方法及びキットである。

【効果】 本発明はDNA鎖抽出過程に於て、有機溶媒の代わりにカオトロピック剤を用いることにより、その後の有機溶媒を除去する過程を省略することができ、操作手順が簡略化されること、始めから終わりまで同じ容器で抽出操作が行えるので、抽出過程でのDNA鎖の損傷、汚染の危険性を最小限に止められること、更にその結果、従来法に比べて高分子のDNA鎖を高精度で抽出できる。また、全血を用いることができるため、血液試料を各細胞成分に分離する繁雑さが解消し、採取後短時間に試料を処理することができる等の点に於て極めて優れた発明であり斯業に貢献するところ大なる発明である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】全血液検体に界面活性剤を接触させて血球細胞の細胞膜を破壊し、露出した細胞核を集め、更に界面活性剤と蛋白質分解酵素で処理して核膜及び核蛋白質を破壊した後、カオトロピック剤と接触させてDNA鎖を遊離させ、該遊離されたDNA鎖を含む溶液にアルコール類を加えてDNA鎖を沈殿させることを特徴とするDNA鎖抽出方法。

【請求項 2】細胞膜を破壊するための界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、請求項 1 に記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項 3】非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルである、請求項 2 に記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項 4】核膜及び核蛋白質を破壊するための界面活性剤が陰イオン性界面活性剤である、請求項 1～3 の何れかに記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項 5】陰イオン性界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDS と略記する。）である、請求項 4 に記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項 6】蛋白質分解酵素がプロティナーゼKである、請求項 1～5 の何れかに記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項 7】カオトロピック剤がよう化ナトリウムである、請求項 1～6 の何れかに記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項 8】アルコール類がイソプロパノールである、請求項 1～7 の何れかに記載のDNA鎖抽出方法。

【請求項 9】①細胞膜を破壊するための界面活性剤、②核膜及び核蛋白質を破壊するための界面活性剤、③蛋白質分解酵素、④カオトロピック剤及び⑤アルコール類を含んで成ることを特徴とする、全血液検体からのDNA鎖抽出キット。

【請求項 10】細胞膜を破壊するための界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、請求項 9 に記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項 11】非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルである、請求項 10 に記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項 12】核膜及び核蛋白質を破壊するための界面活性剤が陰イオン性界面活性剤である、請求項 9～11 の何れかに記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項 13】陰イオン性界面活性剤がSDSである、請求項 12 に記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項 14】蛋白質分解酵素がプロティナーゼKである、請求項 9～13 の何れかに記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項 15】カオトロピック剤がよう化ナトリウムである、請求項 9～14 の何れかに記載のDNA鎖抽出キット。

【請求項 16】アルコール類がイソプロパノールである、請求項 9～15 の何れかに記載のDNA鎖抽出キット。

ト。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の利用分野】本発明は全血液からのDNA鎖の抽出方法及び抽出キットに関する。

【発明の背景】遺伝子疾患の出生前診断や保因子の発見、DNAの多型或は遺伝病や癌などDNAの異常に起因する疾病の原因領域の究明のために、ヒトの遺伝子を抽出、分析する研究が行われている。また、例えばB型肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス等のウイルス性疾患、腫瘍、血有病等の遺伝疾患の診断を、DNAを分析して行う方法が最近盛んになりつつある。また、ヒト・ゲノム・プロジェクトに代表されるように、ヒトの全遺伝情報を解析する研究も盛んに行われているが、遺伝子を分析するには傷をつけずに高分子の状態を保ったままゲノムDNAを調製する必要がある。しかしながら原核生物と異なり、真核生物、特にヒトに代表される高等生物のDNA分子は巨大で、攪拌操作等によって容易に切断されてしまうため、十分注意を払っても、全く損傷を与えることなくDNA分子を抽出することは不可能である。またクロマチン等の核蛋白質が強固にDNA分子と結合しているため、これら核蛋白質の除去操作も必要であり、完全なDNAを精製することはできない。

【0002】従来の方法は、例えば細胞を物理的に、又は界面活性剤等で処理して破壊後、水飽和フェノールやクロロホルム等の有機溶媒を用いて不純物を除去し、次いでアルコールで溶液中のDNA鎖を沈殿させる方法、更にカラムクロマトグラフィーにより精製する方法が一般的である（生化学実験講座2、「核酸の化学 1」, 74～80頁, 262～270頁, 1975年, 東京化学同人、「遺伝子操作マニュアル」, 20～23頁, 1985年, 講談社、他）。しかし、これらの方法ではフェノール、クロロホルムを使用する必要があり、有機溶媒層とDNA層を分離操作する手間或はカラムクロマトグラフィーを行う手間を要するといった欠点を持っている。また、操作が煩雑なため、DNA鎖に傷をつける可能性が高い。また抽出操作中に何回もDNA層を別の容器に移し変えるので、使用容器が細菌等に汚染されていたりすると、試料以外の、これら細菌等の外来DNAが混入してしまう危険性がある。また、これらのこともDNA鎖の抽出効率を悪くしている。更に、抽出操作に用いられるフェノールには、従来①毒性があり、且つ強い蛋白質変性剤であるため、皮膚に接触すると薬傷を引き起こす、②また保存中にフェノールが変性して二価フェノール、キノン等のフェノール性酸化物が生成した場合には、これら酸化物がホスホジエステル結合又はDNA鎖の架橋結合を開裂させて、核酸鎖の変性を引き起こしたりする、等の問題点が、また、クロロホルムやジエチルエーテルには麻醉作用があるため、使用時に中毒を起こす可能性があるという問題点が、更にはフェノールや上記有機溶媒を含む溶液は廃

棄の際に制約を受けるという問題点がある。

【0003】一方、イオン半径の大きな1価の陰イオンを出すカオトロピック剤が蛋白変性剤の一つとして知られていた。カオトロピック剤は水に溶解してカオトロピックイオンを放出し、疎水結合を弱めることが知られており、蛋白質の変性や、膜蛋白質の抽出に用いられてきた。しかしながら、従来は、フェノールには前記した如き種々の問題点があるにも関わらず、血液中のDNA抽出にはこれを蛋白変性剤として用いる方法が一般的であり、カオトロピック剤を血液検体からのDNA抽出に用いようとする試みは今までなされていなかった。

【0004】

【発明の目的】本発明は上記欠点を解決し、DNA鎖を高分子のままで高精度に且つ容易に抽出する方法及び抽出キットを提供することを目的とする。

【発明の構成】本発明は、全血液検体に界面活性剤を接触させて血球細胞の細胞膜を破壊し、露出した細胞核を集め、更に界面活性剤と蛋白質分解酵素で処理して核膜及び核蛋白質を破壊した後、カオトロピック剤と接触させてDNA鎖を遊離させ、該遊離されたDNA鎖を含む溶液にアルコール類を加えてDNA鎖を沈殿させることを特徴とするDNA鎖抽出方法の発明である。また、本発明は①細胞膜を破壊するための界面活性剤、②核膜及び核蛋白質を破壊するための界面活性剤、③蛋白分解酵素、④カオトロピック剤及び⑤アルコール類を含んで成ることを特徴とする、全血液検体からのDNA鎖抽出キットの発明である。

【0005】即ち本発明者等は、血液検体から核酸鎖を有効に抽出する方法について鋭意研究の結果、DNA鎖抽出の過程に於て、従来のフェノール、クロロホルム等の有機溶媒を用いる代わりにカオトロピック剤を用いることが可能なことを見出し、更に、カオトロピック剤を使用することにより、その後の有機溶媒を除去する過程を省略することができるので、操作手順が簡略化されること、DNA層を何回も別の容器に移し変えることなく初めから終わりまで同じ容器で抽出操作が行えるので、DNA鎖抽出過程に於けるDNA鎖の損傷、汚染の危険性を最小限に止められること、更にその結果、従来のフェノールを用いた抽出法に比べて高分子のDNA鎖を高精度で抽出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】本発明に於て用いられる界面活性剤としては、一般に細胞、細菌等から核酸鎖抽出の際に用いられるものであれば、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤等、特に限定されることなく挙げられるが、具体的には例えばドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド等の陽イオン性界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム(以下、SDSと略記する。)、コール

酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンオキシルフェニルエーテル(例えばローム アンド ハース社商品名:トリトンX-100等)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(例えば花王(株)商品名:トウイーン20等)、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(例えば花王(株)商品名:ウィーン80等)、n-オクチル-β-D-グルコシド等の非イオン界面活性剤、例えば3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート、ホスファチジルエタノールアミン等の両性界面活性剤が好ましく挙げられる。中でも、特に例えば血球細胞を破壊する際にはポリオキシエチレンオキシルフェニルエーテル等の非イオン性界面活性剤が、例えば蛋白質分解酵素と共に核膜及び核蛋白質を破壊する際にはSDS等の陰イオン性界面活性剤が好ましく用いられる。これらの使用濃度としては、使用する界面活性剤の種類により多少異なるが、例えば血球細胞を破壊する界面活性剤の場合には、溶液中の濃度として、通常0.1~3%の濃度範囲が挙げられる。また、蛋白質分解酵素と共に核膜及び核蛋白質を破壊する界面活性剤の場合には、溶液中の濃度として、通常0.1~3%の濃度範囲が挙げられる。

【0007】本発明に於て用いられる蛋白質分解酵素としては、例えばプロティナーゼK、プロナーゼ又はリゾチーム等が挙げられるが特にこれらに限定されない。また、これらの使用濃度としては、通常1~10mg/mlの範囲で用いられる。本発明に於て用いられるカオトロピック剤としては、一般にカオトロピック剤として知られているような、水溶液に添加した際にカオトロピックイオン(イオン半径の大きな1価の陰イオン)を生成し、疎水性分子の水溶性を増加させる作用を有しているものであれば特に限定されることなく挙げられるが、具体的には例えばよう化アルカリ、チオシアン酸グアニジン、過塩素酸のアルカリ金属塩、トリフルオロ酢酸のアルカリ金属塩、トリクロロ酢酸のアルカリ金属塩、及びチオシアン酸のアルカリ金属塩等が挙げられる。これらアルカリ金属塩或はよう化アルカリに於けるアルカリ金属の例としては、例えばリチウム、ナトリウム、カリウム等が挙げられる。これらカオトロピック剤の使用濃度は、用いるカオトロピック剤の種類により多少異なるが、一般に溶液中の濃度として2~6Mの範囲で用いられる。特に、よう化ナトリウムを使用する場合には、溶液中の濃度が約3.5~5Mの範囲となるように使用するのが好ましい。

【0008】本発明に於て用いられる抽出溶液中からDNA鎖を沈殿させる方法としては、例えばDNA鎖抽出溶液に、イソプロパノール、エタノール等のアルコール類を添加し、DNA鎖を特異的に沈殿させることによりDNA鎖を回収する方法等が挙げられる。本発明に於て抽出溶液中からDNA鎖を沈殿させる際に用いられるア

ルアルコール類としては、DNA鎖を特異的に沈殿し得る性質を有するものであれば特に限定することなく挙げられるが、具体的には例えばイソプロパノール、エタノール等のアルコール類が挙げられ、特にイソプロパノールが好ましく用いられる。またカオトロピック剤としてよう化ナトリウムを用いる場合には、特にイソプロパノールを用いてDNA鎖の沈殿を行うことがより好ましい。これらの使用濃度としては、DNA鎖が水溶液から沈殿するような濃度であればよく、特に限定されない。

【0009】本発明に於て用いられる、例えば緩衝剤等の試薬類としては、従来この分野で用いられているものの中から適宜選択して用いられればよく、その使用濃度も通常この分野で用いられる範囲から適宜選択すれば足りる。例えば緩衝剤としては、例えばリン酸塩、クエン酸塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(以下、トリスと略記する。)、グリシン等が好ましく挙げられ、その使用濃度としてはDNAの遊離を妨げない範囲であれば特に限定されないが、通常1~500mMの範囲が好ましく挙げられる。また、抽出操作に於て用いられる水(緩衝液も含む)のpHとしては、DNA鎖の遊離を妨げない範囲であれば特に限定されないが、通常2~12の範囲、好ましくは7~9の範囲から適宜選択される。更に、本発明の抽出方法に於て用いられる緩衝液等の水溶液中には、DNA鎖の分離効率を良くするために、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化リチウム等の塩類等が添加されていても良い。これらの該水溶液中の濃度としては、DNA鎖の遊離を妨げない範囲であれば特に限定されないが、該水溶液中の濃度として通常1~500mMの範囲で必要に応じて添加される。

【0010】尚、本発明は通常例えばエチレンジアミン四酢酸(以下、EDTAと略記する。)等のDNaseの阻害剤の共存下で実施することが好ましい。これら阻害剤の使用濃度としては、阻害剤の種類により異なるが、例えばEDTAを用いる場合には、一連の操作に於ける各溶液中の濃度として通常1~200mMの範囲が好ましく挙げられる。

【0011】本発明に係るDNA鎖の抽出方法を具体的に示すと、例えば下記の如くなる。採取した血液試料を全血のまま(EDTA、ヘパリン等の抗血液凝固剤を含んでいてもよい)ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル等の界面活性剤を含む溶液に懸濁して血液細胞を破壊した後、遠心分離を行い、核画分を含む沈殿物を得る。続いて得られた核画分を含む沈殿物にSDS等の界面活性剤及びプロテイナーゼK等のプロテアーゼを加えて一定時間処理し、核膜、核蛋白質等を破壊する。続いてよう化ナトリウム等のカオトロピック剤を加えて

混合した後、イソプロパノール等のアルコール類を加えてDNA鎖を沈殿、精製する。本発明の方法は、例えば、①細胞膜を破壊するための界面活性剤、②核膜及び核蛋白質を破壊するための界面活性剤、③蛋白分解酵素、④カオトロピック剤及び⑤アルコール類を組み合わせる試薬キットを用いて実施することができる。

【0012】本発明は、カオトロピック剤を用いることにより上記種々の問題点を有する有害な有機溶媒を使用する必要がなくなり、しかも有機溶媒除去操作が不要になったために操作手順が簡略化し、DNA鎖損傷の危険性を最小限に止め、短時間に高分子のDNA鎖を高収率で得ることができる。本発明の抽出方法に於ては、血液細胞から有核細胞を分離したのもも試料にできることは勿論であるが、全血を用いることができるため、血液試料を各細胞成分に分離する繁雑さが解消し、採取後短時間に血液試料を処理することができる点に於ても極めて優れた発明である。また、本発明の方法により抽出したDNA鎖は例えばPCR法(Polymerase chain reaction)を用いた臨床診断の分野はもちろん、制限酵素切断反応、サザンブロットによる分析等の分野でも利用することができる。

【0013】

【実施例】

実施例1. ヒト新鮮全血0.5mlにサッカロースを0.32M、塩化マグネシウムを5mM、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルを1%、アジ化ナトリウムを0.2%含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を0.5ml加えて混合した。その後、12,000rpm, 20秒, 4℃で遠心分離した。ペリットに上記の溶液を1ml加えて、マイクロチューブミキサー(MT-360, トミー精工製)にて攪拌した。再度遠心分離を行い、上清を取り除いた。更にこの洗浄操作を1回繰り返した。続いて得られたペリットに1%SDS、1mMEDTAを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)200μlと20mg/mlのプロテイナーゼK10μlを添加した後、37℃で60分間反応させた。その後、最終濃度4.5Mのよう化ナトリウムを加え混合した後、0.5mlイソプロパノールを加え混合した。12,000rpmにて、10分間遠心分離し、DNAを沈殿させた。上清を捨て、沈殿に40%イソプロパノールを1ml添加して洗浄した後乾燥処理し、DNAを得た。得られたDNAをTE緩衝液(EDTAを1mM含む、10mMトリス-塩酸緩衝液、pH8.0)に再度溶解して、得られた溶液の260nmに於ける吸光度を測定しDNAの抽出効率を算出した。また、この溶液をパルスフィールド電気泳動にかけて、得られたDNAの分子量を測定した。結果を表1示す。尚、DNAの抽出効率は、

【式1】

DNAの抽出効率(%)

$$= \text{DNA 収量} \div (\text{試料中の白血球数} \times 6 \text{ pg}) \times 100$$

によって求めた。

註) ヒト細胞(白血球) 1個当りの全DNA量は6ピコグラムである。

【0014】比較例1. 従来法(フェノールを用いた方法)

ヒト新鮮全血試料(EDTA添加) 0.5mlに、サッカロースを64mM、塩化マグネシウムを10mM、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルを2% (w/v) 含む20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.8)を0.5ml加えた。次いで蒸留水で2倍に希釈した上記緩衝液0.3mlを加え、穏やかに攪拌した。氷水中で5分間インキュベートした後、2000rpmで30分間、4℃で遠心分離して核画分を含むペリットを得た。ペリットにNaClを75mM含む24mM EDTA溶液を0.1ml加えて再懸濁させた。更に上記EDTA溶液を0.1ml加えて懸濁後、別の容器に移した。試料に20% SDSを10μl、次いで0.1mgの固形プロテイナーゼ

Kを加え、攪拌後、37℃で2時間反応させた。0.21mlの水飽和フェノールを加えて混合後、2000rpmで10分間遠心分離し、水層を別の容器に移した。上記フェノール抽出操作を再度繰り返し行った。得られた抽出物について、水飽和フェノール-クロロホルム (=1:1 (v/v)) で2回、水飽和クロロホルムで3回、抽出操作を行った。次いで常法に従いエタノールを加えてDNAを沈殿させた後、遠心分離して、目的のDNAを得た。得られたDNAをTE緩衝液に再度溶解して、得られた溶液の260nmに於ける吸光度を測定し、得られたDNA量を測定して、上記算出式よりDNAの抽出効率を算出した。また、この溶液をパルスフィールド電気泳動にかけて、得られたDNAの分子量を測定した。結果を表1に併せて示す。

【表1】

表 1

	実施例 1	比較例 1
操作時間(時間)	1.5	3.5
フェノール使用	無し	有り
DNA抽出効率(%)	95	59
OD 260/280	1.96	1.54
DNA分子量 (ダルトン)	$7.5 \times 10^6$ $\sim 3.0 \times 10^7$	$2.5 \times 10^6$ $\sim 3.0 \times 10^7$

表1より、本発明を用いたDNA鎖の抽出法では、従来のフェノールを用いた精製法と比較して、より短時間に、高分子量のDNA鎖が高収率で得られることが分かる。また、OD 260/280の値が1.8~2であれば蛋白質の混入が少ないことを示すが(遺伝子工学入門, 43~44頁, 1986年, 南山堂等)、表1の結果より、本発明を用いた方法によると、従来のフェノールを用いた精製法よりも蛋白質の混入の少ない精製度の高いDNA鎖が得られることが分かる。

【0015】

【発明の効果】本発明によれば、全血試料へのタンパク質変性剤及びアルコールの添加とその後の遠心分離操作のみで高分子のDNAを得ることができる。また、本発明の全工程を1つの容器内で行うことで外来DNAの混入を軽減することができる。更に、フェノールなどの有機溶媒を使わないため溶媒除去の操作が不要で、試料の損失が少なく、従って高い収率でDNA鎖を抽出することが可能である。また、本発明では更に、有機溶媒抽出操作中のピペットによるDNA鎖の機械的切断を回避することでゲノムDNAを高分子のまま回収することが可

能になっている。本発明は上記の点に於て、特に優れた発明であり、斯業に貢献するところ極めて大なる発明で

ある。

【手続補正書】

【提出日】平成6年1月21日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【発明の利用分野】本発明は全血液からのDNA鎖の抽出方法及び抽出キットに関する。

【発明の背景】遺伝子疾患の出生前診断や保因子の発見、DNAの多型或は遺伝病や癌などDNAの異常に起因する疾病の原因領域の究明のために、ヒトの遺伝子を抽出、分析する研究が行われている。また、例えばB型肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス等のウイルス性疾患、腫瘍、血友病等の遺伝疾患の診断を、DNAを分析して行う方法が最近盛んになりつつある。また、ヒト・ゲノム・プロジェクトに代表されるように、ヒトの全遺伝情報を解析する研究も盛んに行われているが、遺伝子を分析するには傷をつけずに高分子の状態を保ったままゲノムDNAを調製する必要がある。しかしながら原核生物と異なり、真核生物、特にヒトに代表される高等生物のDNA分子は巨大で、攪拌操作等によって容易に切断されてしまうため、十分注意を払っても、全く損傷を与えることなくDNA分子を抽出することは不可能である。またクロマチン等の核蛋白質が強固にDNA分子と結合しているため、これら核蛋白質の除去操作も必要であり、完全なDNAを精製することはできない。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】本発明に於て用いられる界面活性剤としては、一般に細胞、細菌等から核酸鎖抽出の際に用いられるものであれば、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤等、特に限定されることなく挙げられるが、具体的には例えばドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド等の陽イオン性界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム(以下、SDSと略記する。)、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンオキシルフェニルエーテル(例えばローム アンド ハース社商品名：トリトンX-100等)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(例えば花王(株)商品名：トウイーン20等)、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(例えば花王(株)商品名：トウイーン80等)、n-オクチル-β-D-グルコシド等の非イオン界面活性剤、例えば3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート、ホスファチジルエタノールアミン等の両性界面活性剤が好ましく挙げられる。中でも、特に例えば血球細胞を破壊する際にはポリオキシエチレンオキシルフェニルエーテル等の非イオン性界面活性剤が、例えば蛋白質分解酵素と共に核膜及び核蛋白質を破壊する際にはSDS等の陰イオン性界面活性剤が好ましく用いられる。これらの使用濃度としては、使用する界面活性剤の種類により多少異なるが、例えば血球細胞を破壊する界面活性剤の場合には、溶液中の濃度として、通常0.1～3%の濃度範囲が挙げられる。また、蛋白質分解酵素と共に核膜及び核蛋白質を破壊する界面活性剤の場合には、溶液中の濃度として、通常0.1～3%の濃度範囲が挙げられる。

[Title of the Invention] An extraction method for DNA from whole blood and an extraction kit

[Claims]

[Claim 1] A DNA strand extraction method wherein there is destroyed the cell membrane of a hemocyte by bringing a surfactant in contact with a whole blood specimen, collecting the exposed cell nucleus, and after destroying the nuclear membrane and nucleoprotein by further processing using a surfactant and proteolytic enzyme, the DNA strand is liberated by bringing into it into contact with a chaotropic agent and the DNA strand is precipitated by adding alcohol to the solution containing the liberated DNA strand.

[Claim 2] A DNA strand extraction method according to Claim 1 wherein the surfactant for destroying the cell membrane is a nonionic surfactant.

[Claim 3] A DNA strand extraction method according to Claim 2 wherein the nonionic surfactant is polyoxyethylene octyl phenyl ether.

[Claim 4] A DNA strand extraction method according to any one of the Claims 1-3 wherein the surfactant for destroying the nuclear membrane and the nucleoprotein is an anionic surfactant.

[Claim 5] A DNA strand extraction method according to Claim 4 wherein the anionic surfactant is sodium dodecyl sulfate (hereinafter referred to as SDS).

[Claim 6] A DNA strand extraction method according to any one of the Claims 1-5 wherein the proteolytic enzyme is protenase K.

[Claim 7] A DNA strand extraction method according to any one of the Claims 1-6 wherein the chaotropic agent is sodium iodide.

[Claim 8] DNA strand extraction method according to any one of the Claims 1-7 wherein the alcohol is isopropanol.

[Claim 9] A DNA strand extraction kit for whole blood specimens wherein there is contained ① a surfactant for destroying the cell membrane, ② a surfactant for destroying the nuclear membrane and nucleoprotein, ③ a proteolytic enzyme, ④ a chaotropic enzyme, and ⑤ alcohols.

[Claim 10] A DNA strand extraction kit according to Claim 9 wherein the surfactant for destroying the cell membrane is a nonionic surfactant.

[Claim 11] A DNA strand extraction kit according to Claim 10 wherein the nonionic surfactant is polyoxyethylene octyl phenyl ether.

[Claim 12] A DNA strand extraction kit according to any one of the Claims 9-11 wherein the surfactant for destroying nuclear membrane and nucleoprotein is an anionic surfactant.

[Claim 13] A DNA strand extraction kit according to Claim 12 wherein the anionic surfactant is SDS.

[Claim 14] A DNA strand extraction kit according to any one of Claims 9-13 wherein the proteolytic enzyme is protenase K.

[Claim 15] A DNA strand extraction kit according to any one of the Claims 9-14 wherein the chaotropic agent is sodium iodide.

[Claim 16] A DNA strand extraction kit according to any one of the Claims 9-15 where the alcohol is isopropanol.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Application Field of the Invention] This invention relates to an extraction method for DNA strands from whole blood and to an extraction kit.

[Background of the Invention] In order to investigate the sources of diseases which occur in abnormalities of DNA such as with hereditary diseases or cancer, research is performed for the prenatal diagnosis of genetic illnesses and the discovery of carriers, and polymorphic DNA. Such research extracts and analyzes human genes. In addition, for example, recently methods which analyze the diagnosis of viral diseases such as hepatitis B and human papilloma virus, neoplasms, and hereditary diseases such as blood diseases and analyze DNA continue to flourish. In addition, as represented by the Human Genome Project, research which analyzes all human genetic information is prospering.

Consequently, it is necessary to prepare unaltered genomic DNA which maintains macromolecular conditions without damage for gene analysis. However, DNA molecules of higher organisms, unlike prokaryotes and eukaryotes, and for especially humans, are massive, and in order to easily extract by stirring and the like, even being sufficiently cautious, total breakdown occurs, and extraction of the DNA molecule is impossible. In addition, nucleoprotein, such as chromatin, is strongly bonded to DNA molecules. It is also necessary to eliminate these proteins, so it is not possible to prepare perfect DNA.

[0002] Conventional methods process cells physically or using surfactants, and after destruction, there is elimination of the impurities by using organic solvents such as water saturated phenol or chloroform, and following, there is a method which precipitates the DNA strand in a solution using alcohol, and further, there is a general method which purifies by column chromatography (Biochemistry Experiments Lecture 2, "Nucleic Acid Chemistry I", p.74-80, p. 262-270, 1975, Tokyo Kagaku Dojin, "Genetic Operation Manual", p. 20-23, 1985, Kodansha, others). However, with these methods, it is necessary to use phenol and chloroform, and they have the shortcomings of requiring time and effort for the separation operation of the organic solvent layer and the DNA layer as time and effort is required for column chromatography. In addition, because actual execution is complicated, there is a high probability that the DNA strand will be damaged. In addition, because the DNA layer is repeatedly moved and changed into other containers during extraction, when the containers are contaminated by bacteria and the like, there is the danger that foreign DNA from these bacteria and the like will mix. In addition, the extraction efficiency of these DNA is poor. Furthermore, with the phenol which is used for the extraction operation, conventionally, there is ① toxicity, and because there are strong protein denaturation agents, injuries will occur, if contact is made with the skin, and ② phenol denaturalizes while during preservation so when a phenol oxide is generated, such as dihydric phenol, quinone, and the like, these oxides open the phosphodiester bonds or the cross-linking bonds of the DNA strand, denaturizing the nucleic acid strand. Other problems exist because of anesthetic actions which take place with the use of chloroform or diethylether, and when used, there is the possibility of poisoning. Also, solutions, which contain phenol or the previously described organic solvents, necessitate restraint when discarding.

[0003] On the other hand, chaotropic agents which produce univalent anion of large ionic radius are known as one protein denaturalizing agent. The chaotropic agent emits chaotropic ions when dissolved in water, whose action is known to weaken hydrophobic



bonds, although chaotropic agents have been used for proteinic denaturation and extraction of membrane protein. However, conventionally, phenol, without remarking on the already expressed problems, is included in general methods where it is used as a protein denaturizing agent in the extraction of DNA in the blood, though, up to now, experiments using chaotropic agents for the extraction of DNA from blood specimens have not been made.

[0004]

[Object of the Invention] This invention solves the previously described shortcomings, and has as its goal to provide a method which easily and with high accuracy extracts DNA strands as macromolecules. Also the invention provides an extraction kit.

[Constitution of the Invention] This invention is an invention for a DNA strand extraction method wherein there is destroyed the cell membrane of a hemocyte by bringing a surfactant in contact with a whole blood specimen, collecting the exposed cell nucleus, and after destroying the nuclear membrane and nucleoprotein by further processing using a surfactant and proteolytic enzyme, the DNA strand is liberated by bringing into it into contact with a chaotropic agent and the DNA strand is precipitated by adding alcohol to the solution containing the liberated DNA strand. In addition, this invention is the invention of a DNA strand extraction kit for whole blood specimens which is formed by including ① a surfactant for destroying cellular membranes, ② surfactant for destroying nuclear membranes and nucleic protein, ③ a proteolytic enzyme, ④ a chaotropic agent, and ⑤ alcohols.

[0005] That is, the inventors, seeking a process which effectively extracts nucleic acid strands from blood specimens, as the result of diligent research with processes for DNA strand extraction, have discovered that it is possible to use chaotropic agents in place of organic solvents such as phenol, chloroform, and the like, and furthermore, by using chaotropic agents, because it is possible to abbreviate in the future processes which eliminate organic solvents, the invention can shorten operational procedures. Because there can be performed an extraction operation using the same vessel from beginning to end, not moving repeatedly the DNA layer, the risk of damage and contamination to the DNA strand in the DNA strand extraction process can be constrained to a minimum. Thus, the effect of this invention is the discovery of the ability to extract with a high degree of accuracy DNA strands of macromolecules, compared to extraction methods that used conventional phenol. With this discovery, the invention is complete.

[0006] The surfactants that are used in this invention, generally, if used for nuclei acid strand extraction from cells, bacteria, etc. have been cited as cationic surfactants, anionic surfactants, nonionic surfactants, and amphoteric surfactants, etc., though not especially limited to these types of surfactants, and concretely, for example, cationic surfactants, such as a dodecyltrimethylammonium bromide, dodecyl trimethylammonium chloride, and cetyl trimethylammonium bromide, and sodium dodecyl sulfate (hereinafter referred to as SDS), anionic detergents, such as cholic acid sodium, sodium deoxycholate, and N-lauroyl sarcosine sodium, polyoxyethylene octyl phenyl ether (for example, Rome and Haas trade name: triton X-100 grade), polyoxyethylene sorbitan monolaurate (for example, the Kao Corp. trade name: Tween 20 grade), polyoxyethylene sorbitan monooleate (for example, the Kao Corp. trade name: Vienna 80 grade), amphoteric surface active agents, such as nonionic surface active agents, for example, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, such as an n-octyl- $\beta$ -D-

glucoside, and phosphatidylethanolamine, are mentioned preferably. Among the chemicals mentioned, especially when, for example, for use in destroying hemocytes, nonionic surfactants such as polyoxyethylene octyl phenyl ether, along with proteolytic enzymes, are preferably used as well as anionic surfactants such as SDS, when destroying nucleic membranes and nucleoproteins. The concentrations used are of wide variation according to the kind of surfactant used. For example, for the case of a surfactant which destroys hemocytes, the concentration within the solution has been cited as normally 0.1-3.0%. In addition, for the case of using proteolytic enzymes with surfactants for destroying nucleic membranes and nucleoproteins, the concentration in the solution has been cited as normally 0.1-3%.

[0007] The proteolytic enzymes that are used with this invention have been cited as, but not limited to, proteinase K, pronase, or lysozyme. In addition, the concentrations that are used are normally in the range of 1-10mg/ml. The chaotropic agents that are used in this invention generate chaotropic ions (univalent anion with a large ionic radius), generally known as chaotropic agents, when added to aqueous solutions. If used to increase the water solubility of hydrophobic molecules, agents can be cited, but are not limited to this action, and concretely, the following can be mentioned: iodine alkali, thiocyanic acid guanidine, alkali-metal salt of perchloric acid, alkali-metal salt of trifluoroacetic acid, alkali-metal salt of a trichloroacetic acid, and alkali-metal salt of thiocyanic acid, etc. As an example for the alkali metal in these alkali-metal salts or alkali iodides, lithium, sodium, a potassium, etc. are mentioned. The concentrations that are used for these chaotropic agents, vary widely according to the kind of chaotropic agent which is used, but, generally, the concentration is in the range of 2-6M as the concentration within the solution. Especially, when using sodium iodide, a preferable concentration is in the range of 3.5-5M.

[0008] The methods of precipitating the DNA strand from within the extraction solution which is used in this invention can be cited as methods which recover the DNA strand by adding alcohol such as isopropanol, ethanol, etc to the DNA strand extraction solution, then specifically precipitating the DNA strand. Alcohols which are used for precipitating the DNA strand from within the extraction solution in this invention can be cited, not being restrictive, as those which have the ability to specifically precipitate the DNA strand. More concretely, alcohols, for example, such as isopropanol, ethanol, etc. have been mentioned, though isopropanol is preferable. In addition, when using sodium iodide as a chaotropic agent, it is especially appropriate to use isopropanol to precipitate the DNA strand. The concentrations that are used are not especially restricted, as long as they execute precipitation of the DNA strand from the aqueous solution.

[0009] The reagents which are used in this invention, such as buffers, may be appropriately selected from among those that are used conventionally, and the concentrations used can be within ranges which are appropriately and normally selected. For example, as a buffer, phosphates, citrates, tris (hydroxymethyl) aminomethane (hereinafter referred to as tris), and glycines are preferable and have been cited, with the concentrations to be used, not especially restricted as long as the buffers do not impede isolation of the DNA. Normally concentrations in the range of 1-500mM have been mentioned. In addition, the pH of the water (includes buffer solution) which is used in the extraction operation is not especially restricted as long as the pH selected does not impede the isolation of the DNA, with the citing of pH in the range of 2-12 being

considered normal, and 7-9 as preferable. Furthermore, within aqueous solutions as buffers which are used in the extraction method of this invention, in order that good separation efficiency for the DNA strand is obtained, salts are added, for example, sodium chloride, potassium chloride, magnesium chloride, and lithium chloride, etc. The concentrations of these salts within the aqueous solution are not especially restricted as long as isolation of the DNA strand is not impeded. These salts are added as needed to the aqueous solution, with normal concentrations in the range of 1-500mM.

[0010] Moreover, it is normal and preferable to implement the invention under the coexistence of a DNase inhibitor, such as ethylenediaminetetraacetic acid, etc. (hereinafter referred to as EDTA.). The concentrations of these inhibitors differ according to the kind of inhibitor. For example, when using EDTA, as a concentration within every solution in one series of operations, a concentration in the normal range of 1-200mM is preferable and has been mentioned in the literature.

[0011] The following discussion illustrates specifically the extraction method related to this invention for DNA strands. After suspending an extracted whole blood specimen in a solution which contains a surfactant such as polyoxyethylene octyl phenyl ether with the whole blood (anticoagulants, such as EDTA and heparin, may be included), the blood cells are destroyed, centrifugal separation is performed to obtain a precipitate which contains a nucleus fraction. Then, surfactants such as SDS and proteinases, such as proteinase K, are added to the precipitate which contains the obtained nucleus fraction and the combination is processed for a fixed time, destroying the nuclear membrane, nucleoprotein, etc. Next, after adding a chaotropic agent, such as sodium iodide, and mixing, further adding an alcohol such as isopropanol, there is precipitation of the DNA strand and purification. The method of this invention can be executed by using a reagent kit which is comprised of combinations of ① surfactants to destroy cell membranes, ② surfactants to destroy nuclear membranes and nucleoproteins, ③ proteolytic enzymes, ④ chaotropic agents, and ⑤ alcohols.

[0012] It is not necessary with this invention to use harmful organic solvents which have the previously described problems and instead chaotropic agents are used. Furthermore, because an operation which removes the organic solvents is not necessary, operational procedures are shortened and the risk of DNA strand damage is kept to a minimum. It is possible to obtain a DNA strand of a macromolecule in a short period of time with high efficiency. With the extraction method of this invention, of course, the result of isolating the nucleated cell from a blood cell can be made into a sample. Because it is possible to use whole blood, the complexity of isolating the blood specimen into each of its cellular components is eliminated, to give an extremely superior invention also from the point of view of being able to process blood specimens in a short period after extraction. In addition, the DNA strand which was extracted by the method of this invention can, of course, be used in the field of analysis by restriction enzyme cutting reaction and Southern blotting, as well as in the field of the clinical diagnosis which used the PCR method (polymerase chain reaction).

[0013]

[Examples]

[Example 1] Add to fresh human whole blood 0.5ml of 10mM tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 7.5) which contains saccharose 0.32M, magnesium chloride 5mM, polyoxyethylene octyl phenyl ether 1%, and sodium azide 0.2%, and mix. Afterwards, perform centrifugal separation at 12,000 rpm, for 20 seconds at 4 °C. Add 1ml of the solution to the pellet, and stir in a micro tube mixer (MT-360 Tomys product). Perform once again centrifugal separation and eliminate the supernatant liquid. Then, repeat the washing once more. Next, after adding 10mM tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 8.0) 200µl and 20mg/ml protenase K 10µl which contain 1% SDS and 1mM EDTA to the obtained pellet, react at 37 °C for 60 minutes. Afterwards, add 4.5M sodium iodide of final concentration and mix, and then add 0.5ml isopropanol and mix. Centrifugally separate at 12,000rpm for 10 minutes, and precipitate the DNA. Discard the supernatant liquid and after adding 1ml of 40% isopropanol to the precipitate, wash and dry to obtain DNA. Once again dissolve the obtained DNA in a TE buffer solution (containing 1mM EDTA, 10mM tris-hydrochloric-acid buffer solution, pH8.0) and measure the absorbency at 260nm for the obtained liquid, calculating the extraction efficiency for DNA. In addition, pulse field electrophoresis is applied to this solution and the molecular weight of the obtained DNA is measured. The results are shown in Table 1. Moreover, the extraction efficiency is calculated as

[Equation 1]

DNA extraction efficiency = DNA yield / (white blood cells within the sample × 6pg) × 100.

Note: The total DNA amount per one human cell (white blood cell) is 6 pico grams.

[0014] Comparative Example 1. Conventional Method (method using phenol)

Add to 0.5 ml of a fresh human whole blood specimen (EDTA added) 0.5ml of a 20mM tris-hydrochloric-acid buffer solution pH 7.8) which contains saccharose 64mM, magnesium chloride 10mM, polyoxyethylene octyl phenyl ether 2% (w/v). Next, add the buffer solution 0.3ml which has been diluted 2 times using distilled water, and quietly stir. After incubating for 5 minutes in iced water, centrifugally separate at 2000 rpm, for 30 minutes at 4 °C to obtain a pellet which contains a nucleus fraction. Add 0.1 ml of 24mM EDTA solution which contains 75mM of NaCl to the pellet and re-suspend. After adding 0.1 ml of the EDTA solution and suspending, move to a separate vessel. Add 10 µl of 20% SDS and next 0.1mg of solid protenase K to the specimen, and after stirring, react for 2 hours at 37 °C. After adding water saturated phenol 0.21ml and mixing, centrifugally separate at 2000 rpm for 10 minutes. Then move the water layer to a separate vessel. Perform once again the phenol extract operation. In order to obtain extract material, perform the extraction operation, twice with water saturated phenol-chloroform (= 1:1 (v/v)), and 3 times with water saturated chloroform. Next add ethanol following usual methods, and after precipitating the DNA, centrifugally separate to obtain the objective DNA. Once again dissolve the obtained DNA in the TE buffer solution and measure the absorbency of the obtained solution at 260nm. After measuring the amount of the obtained DNA, calculate the extraction efficiency of the DNA by the previously described calculation equation. In addition, pulse field electrophoresis is

applied to this solution and the molecular weight of the obtained DNA is measured. The results are also shown in Table 1.

Table 1

	Example 1	Comparative Example 1
Operational time (hours)	1.5	3.5
Phenol use	No	Yes
DNA extraction efficiency (%)	95	59
OD 260/280	1.96	1.54
DNA molecular weight (Daltons)	$7.5 \times 10^8$ to $3.0 \times 10^7$	$2.5 \times 10^8$ to $3.0 \times 10^7$

From the table, with the extraction method for DNA strands which is used in this invention, in comparison with the refinement method which used conventional phenol, it is understood that the operational time is shorter and that a high molecular weight DNA extract was obtained at high efficiency rates. In addition, if the value of OD 260/280 is 1.8-2, mixing of the DNA strand with proteins is shown to be slight (Genetic Chemistry Introduction, pp. 43-44, 1986, Nanzando) and from the results in Table 1, according to the method which was used with this invention, it is understood that the DNA extract that was obtained with high refinement had little mixing with proteins compared to the refinement method which used conventional phenol.

[0015]

[Effect of the Invention] According to the invention, it is possible to obtain macromolecular DNA by only the addition of protein denaturing agents and alcohol to whole blood specimens and afterwards centrifugally separating. In addition, it is possible to reduce mixing with foreign DNA by performing the entire process of the invention using a single vessel. Furthermore, it is not necessary to have an operation which eliminates solvents, because there is no use of organic solvents such as phenol, so that damage to the specimen is slight. Consequently, it is possible to extract DNA strands with high efficiency. In addition, with this invention, it becomes possible to recover genomic DNA as a macromolecule by avoiding mechanical cutting of the DNA strand by a pipette in organic solvent extract operations. Because of the above-mentioned points, this invention is an especially superior invention which can significantly contribute to this industry.

## WRITTEN AMENDMENTS

[Filing Date] January 21, 1994

[Amendment 1]

[Document Amended] Specification

[Item Amended] 0001

[Method of Amendment] Modification

[Amendment Details]

[0001]

[Application Field of the Invention] This invention relates to an extraction method for DNA strands from whole blood and to an extraction kit.

[Background of the Invention] In order to investigate the sources of diseases which occur in abnormalities of DNA, such as with hereditary diseases or cancer, research is performed for the prenatal diagnosis of genetic illnesses and the discovery of carriers, and polymorphic DNA which extracts and analyzes human genes. In addition, for example, recently methods which analyze the diagnosis of viral diseases such as hepatitis B and human papilloma virus, neoplasms, and hereditary diseases such as blood diseases and analyze DNA continue to flourish. In addition, as represented by the Human Genome Project, research which analyzes all human genetic information is prospering and it is necessary to prepare unaltered genomic DNA which maintains macromolecular conditions without damage for gene analysis. However, DNA molecules of higher organisms, unlike prokaryotes and eukaryotes, and especially like humans are massive. In order to easily extract by stirring and the like, even being sufficiently cautious, total breakdown occurs, and extraction of the DNA molecule is impossible. In addition, nucleoprotein, such as chromatin, is strongly bonded to DNA molecules, and as it is also necessary to eliminate these proteins, it is not possible to prepare perfect DNA.

[Amendment 2]

[Document Amended] Specification

[Item Amended] 0006

[Method of Amendment] Modification

[Amendment Details]

[0006] The surfactants that are used in this invention, generally, if used for nuclei acid strand extraction from cells, bacteria, etc. have been cited as cationic surfactants, anionic surfactants, nonionic surfactants, and amphoteric surfactants, etc., though not especially limited to these types of surfactants, and concretely, for example, cationic surfactants, such as a dodecyltrimethylammonium bromide, dodecyl trimethylammonium chloride, and cetyl trimethylammonium bromide, and sodium dodecyl sulfate (hereinafter referred to as SDS.), anionic detergents, such as cholic acid sodium, a sodium deoxycholate, and N-lauroyl sarcosine sodium, polyoxyethylene octyl phenyl ether (for example, Rome and Haas trade name: triton X-100 grade), polyoxyethylene sorbitan monolaurate (for example, the Kao Corp. trade name: Tween 20 grade), polyoxyethylene sorbitan monooleate (for example, the Kao Corp. trade name: Vienna 80 grade), amphoteric surface active agents, such as nonionic surface active agents, for example, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, such as an n-octyl- $\beta$ -D-glucoside, and phosphatidylethanolamine, are mentioned preferably. Among the chemicals mentioned, especially when, for example, destroying hemocytes, nonionic surfactants such as polyoxyethylene octyl phenyl ether, along with proteolytic enzymes,

are preferably used as well as anionic surfactants such as SDS, when destroying nucleic membranes and nucleoproteins. The concentrations used are of wide variation according to the kind of surfactant used, for example, for the case of a surfactant which destroys hemocytes, the concentration within the solution has been cited as normally 0.1-3.0%. In addition, for the case of using proteolytic enzymes with surfactants for destroying nucleic membranes and nucleoproteins, the concentration in the solution has been cited as normally 0.1-3%.